

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関  
国際事務局



(43)国際公開日  
2005年9月1日 (01.09.2005)

PCT

(10)国際公開番号  
WO 2005/079826 A1

- (51)国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 38/00, 38/17, A23L 1/30, 1/305, A61P 3/02
- (21)国際出願番号: PCT/JP2005/001752
- (22)国際出願日: 2005年2月7日 (07.02.2005)
- (25)国際出願の言語: 日本語
- (26)国際公開の言語: 日本語
- (30)優先権データ:  
特願2004-048417 2004年2月24日 (24.02.2004) JP
- (71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋1丁目15番1号 Tokyo (JP).
- (72)発明者; および
- (75)発明者/出願人(米国についてのみ): 小寺智博 (KODERA, Tomohiro) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 丹尾式希 (NIO, Noriki) [JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋1丁目15番1号 味の素株式会社内 Tokyo (JP). 村上仁志 (MURAKAMI, Hitoshi) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP).
- (74)代理人: 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号 神谷町MTビル19階 Tokyo (JP).
- (81)指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84)指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SOOTHING AGENT AND FOOD FOR TREATING FATIGUE

(54)発明の名称: 疲労回復剤及び疲労回復用食品

WO 2005/079826 A1

(57) Abstract: It is intended to provide a soothing agent and a food for treating fatigue by which physical strength can be quickly restored from exhaustion (i.e., the state with lowered spontaneous motility), for example, after having exercises or exhausting labors or immediately after waking in early morning, decline of physical strength can be prevented and physical strength can be maintained. Namely, a soothing agent or a revitalizing agent which contains a peptide which is a protein decomposition product obtained by decomposing a protein-containing material with thiol protease originating in sprouting soybean cotyledon and/or serine protease originating in a microorganism.

(57)要約: 運動や体力を要する仕事を行った後や早朝起床時のような体が疲労している状態(自発運動量が減少している状態)から体力をいち早く回復させたり、体力の低下を防止し、体力を維持することのできる疲労回復剤及び疲労回復用食品を提供することを目的とする。タンパク質含有原料を、発芽ダイズ子葉由来のチオールプロテアーゼ及び/又は微生物に由来するセリンプロテアーゼにより分解して得られるタンパク質分解ペプチドを含有する疲労回復又は滋養強壮剤。

## 明細書

### 疲労回復剤及び疲労回復用食品

#### 技術分野

[0001] 本発明は、日常生活で疲れを感じたり、激しい若しくは長時間の運動や労働で疲労困憊したり起床時に不定愁訴を感じる者が使用するための疲労回復剤及び疲労回復用食品に関するものである。

#### 背景技術

[0002] 従来から疲労回復剤として生活者に多用されている滋養強壮飲料は、各種ビタミン、カフェイン、タウリンなどを主成分とするが、ビタミン、タウリンなどには明確な疲労回復効果は示されおらず、また疲労回復効果が認められているカフェインも中枢神経系への作用によるものであり、疲労の原因を根本的に解決するものではない。

[0003] また、朝鮮人参、ローヤルゼリーやプロポリスプロテインは、疲労回復効果が認められる場合にあっても、その作用点・作用機序等が明確ではなく、さらに、これらの製品の全ては味及び臭い等の官能上にも大きな問題があり、医薬品的な形状以外では使用し難く、日常の食生活の中で多用することは困難であると考えられる。

また、アンセリン、カルノシンといったジペプチドなどにも疲労回復効果があることが報告されているが、酵素分解により得られたペプチドは強い苦味を持つことからやはり官能上の問題がある。

[0004] これらのことから、官能的にも問題がなくかつ効果的に疲労回復効果をもつ物質が望まれている。

特許文献1:特表平5-505524号公報

特許文献2:特開平8-264号公報

特許文献3:特開平9-121870号公報

特許文献4:特開2000-83695号公報

特許文献5:米国特許第4266031号明細書

非特許文献1:「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbor, 1982, p. 4

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、運動や体力を要する仕事を行った後や早朝起床時のような体が疲労している状態(自発運動量が減少している状態)から体力をいち早く回復させたり、体力の低下を防止し、体力を維持することのできる疲労回復剤及び疲労回復用食品を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0006] 本発明者は、前記記載の目的を達成すべく鋭意研究の結果、発芽ダイズ子葉由来のチオールプロテアーゼ及び／又は微生物に由来するセリンプロテアーゼによりタンパク質を分解して得られるタンパク質分解ペプチドが優れた疲労回復効果及び滋養強壮効果を有することを見出し本発明を完成させるに至った。

[0007] 即ち、本発明は以下の発明を包含する。

[0008] (1)タンパク質含有原料を、発芽ダイズ子葉由来のチオールプロテアーゼ及び／又は微生物に由来するセリンプロテアーゼにより分解して得られるタンパク質分解ペプチドを含有する疲労回復又は滋養強壮剤。

[0009] (2)前記タンパク質含有原料が、カゼイン、小麦タンパク質及びカツオ節からなる群より選択される前記(1)記載の疲労回復又は滋養強壮剤。

[0010] (3)タンパク質含有原料を、発芽ダイズ子葉由来のチオールプロテアーゼ及び／又は微生物に由来するセリンプロテアーゼにより分解して得られるタンパク質分解ペプチドを含有する疲労回復用又は滋養強壮用食品。

[0011] (4)前記タンパク質含有原料が、カゼイン、小麦タンパク質及びカツオ節からなる群より選択される前記(3)記載の疲労回復用又は滋養強壮用食品。

### 発明の効果

[0012] 本発明により、疲労回復効果及び滋養強壮効果に優れた疲労回復剤及び疲労回復用食品が提供される。また、本発明による疲労回復剤及び疲労回復食品は苦味等の官能上の問題がないため容易に摂取することができる。

### 図面の簡単な説明

[0013] [図1]実施例1の結果を示す図である。

[図2]実施例2の結果(自発運動量の変化)を示す図である。

[図3]実施例3の結果(自発運動量の変化)を示す図である。

[図4]実施例4の結果(自発運動量の変化)を示す図である。

[図5]実施例5の結果(自発運動量の変化)を示す図である。

### 発明を実施するための最良の形態

[0014] 以下に本発明について詳細に説明する。

[0015] 本発明で用いるタンパク質分解ペプチドは、タンパク質含有原料を発芽ダイズ子葉由来のチオールプロテアーゼ及び／又は微生物に由来するセリンプロテアーゼで分解することにより得られる。

[0016] 本発明で用いられる発芽ダイズ子葉由来のチオールプロテアーゼ(以下、「D3」という。)は公知であり、発芽ダイズ子葉に由来し、ダイズ種子貯蔵タンパク質をアミノ酸又は低分子ペプチドまで分解しえるタンパク質分解酵素であり、以下の性質を有することが知られている:

(a) 至適pH: 約3~7

(b) 至適温度: 約30~50°C

(c) 分子量(SDS-PAGE): 約26~30KD

(d) 阻害剤: トランス-エポキシサクシニル-L-ロイシルアミド(4-グアニジノ)-ブタンで阻害される

(e) 活性化剤: 2-メルカプトエタノール、システイン、還元型グルタチオンで活性化される

D3を発芽ダイズ子葉から分離精製する方法は公知の方法により実施することができ、例えば、特開平8-264号公報に詳細に記載されている。

[0017] また、本発明で用いられるD3としては、発芽ダイズ子葉から直接得られるD3だけでなく、遺伝子組換えにより得られる形質転換体が生産するD3を用いることももちろん可能である。形質転換体を用いてD3を製造する方法は公知であり、例えば、D3をコードするDNAを適当な発現ベクターに組み込み、この発現ベクターを大腸菌や酵母等の微生物や細胞に導入してD3を生産する形質転換体を得ることができる。この

のような組換えD3の製造方法については、例えば、特開平09-121870号公報「新規チオールプロテアーゼをコードするDNAおよびこれを用いた該チオールプロテアーゼの製造方法」に詳細に記載されている。

- [0018] D3には2種類のアイソザイム(D3- $\alpha$  及びD3- $\beta$ )が存在するがどちらも使用できる。D3- $\alpha$  及びD3- $\beta$  のアミノ酸配列を配列番号1及び配列番号2に示す。
- [0019] 本発明で用いることのできるD3としては、配列番号1又は配列番号2に示したアミノ酸配列を有するものだけでなく、その誘導体も用いることができる。ここで、D3の「誘導体」とは、天然タンパク質D3の天然アミノ酸配列のC-末端及び/又はN-末端に1若しくは複数個のアミノ酸を付加することにより、天然アミノ酸配列における1若しくは複数の異なる部位での1若しくは複数のアミノ酸の置換により、天然タンパク質のいずれかの又は両方の末端における或いはアミノ酸配列における1若しくは複数の部位での1若しくは複数のアミノ酸の欠失により、あるいは天然アミノ酸配列における1若しくは複数の部位での1若しくは複数のアミノ酸の挿入により、この酵素のタンパク質分解活性がこれによって損傷を受けていないことを条件として、天然酵素D3から誘導されたタンパク質分解酵素を意味するものと理解される。
- [0020] 次に、本発明で用いることのできる微生物に由来するセリンプロテアーゼ(以下、「GSP」ともいう。)について説明する。
- [0021] 該セリンプロテアーゼは公知であり、グルタミン酸(Glu)残基のC-末端側及びアスパラギン酸(Asp)残基のC-末端側を特異的に切断するタンパク質分解酵素であり、以下の性質を有することが知られている：
- (a) 至適pH: 約6.5～10
  - (b) 至適温度: 約40～65°C
  - (c) 分子量(SDS-PAGE): 約22～28KD
  - (d) 阻害剤: ジイソプロピルホスホフルオリデートによって阻害されるが、フェニルメタノスルホニルフルオリドによっては阻害されない
  - (e) 活性化剤: カルシウムイオン
- 上記のようなセリンプロテアーゼを產生する微生物としては、例えば、バチルス属、ストレプトミセス属、スタフィロコッカス属及びアクチノミセス属等に属する微生物が挙

げられる。より具体的には、例えば、バチルス・リシェニホルミス(*Bacillus licheniformis*)、バチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)、ストレプトミセス・サーモブルガリス(*Streptomyces thermophilus*)、ストレプトミセス・グリセウス(*Streptomyces griseus*)、スタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*)等が挙げられる。本発明で用いられるGSPとしては上記のような微生物の培養物から周知の方法、例えば、米国特許第4, 266, 031号及び特表平5-505524号公報等に記載の方法により単離精製することができる。

[0022] また、本発明で用いられるバチルス属に属する微生物に由来するGSPは、バチルス属に属する微生物の突然変異体、例えばスブチリシンAをコードする遺伝子が、例えば前記の米国特許第4, 266, 031号に開示された方法による突然変異誘発物質(例えばニトソグアニジン)の利用を含む常用の突然変異誘発方法によって不活性化された突然変異体から得られたものであってもよい。さらには、本発明で用いられるGSPは、遺伝子組換えによって得られたGSP、すなわちこの酵素を生産する微生物、例えばバチルス・リシェニホルミスのcDNA又はゲノムライブラリーからGSPをコードするDNA配列を単離し、このDNA配列を適切な発現ベクターに挿入せしめ、このベクターによって適當な宿主微生物を形質転換せしめ、この酵素の生産を助長せしめる条件のもとでこの宿主を増殖せしめ、そしてこの培養物からGSPを回収することによって得られるGSPも用いることができる。これらの工程は標準の方法によって行なわれる。T. Maniatisら、*Molecular Cloning:A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, 1982を参照のこと。なお、GSPのアミノ酸配列を配列番号3に示す。

[0023] 本発明で用いることのできるGSPとしては、配列番号3に示したアミノ酸配列を有するものだけでなく、その誘導体も用いることができる。ここで、GSPの「誘導体」とは、天然タンパク質GSPの天然アミノ酸配列のC-末端及び/又はN-末端に1若しくは複数個のアミノ酸を付加することにより、天然アミノ酸配列における1若しくは複数の異なる部位での1若しくは複数のアミノ酸の置換により、天然タンパク質のいづれかの又は両方の末端における或いはアミノ酸配列における1若しくは複数の部位での1若しくは複数のアミノ酸の欠失により、あるいは天然アミノ酸配列における1若しくは複数の部位での1若しくは複数のアミノ酸の挿入により、この酵素のタンパク質分解活

性がこれによって損傷を受けていないことを条件として、天然酵素GSPから誘導されたタンパク質分解酵素を意味するものと理解される。

- [0024] GSPは他のプロテアーゼが不活性化されている突然変異株、例えばバチルス リシエニホルミス株の場合はスブチリシンAをコードする遺伝子が、例えば実質的に不活性化されている突然変異体で調製した場合においても、培養プロセスから目的プロテアーゼ分画するほうが望ましい。分画方法としては硫酸沈殿による分画や、膜処理による分画、イオン交換樹脂やゲルろ過クロマトグラフィーによる分画などいずれの方法でも良い。またプロテアーゼ以外の酵素の存在であれば、タンパク質分解物の特性に影響を与えない。
- [0025] 本発明で用いられるタンパク質原料としてはタンパク質成分を含む物質又は材料であれば特に限定されないが、好ましくはタンパク質成分として、乳漿タンパク質、カゼイン、肉類タンパク質、魚類タンパク質、赤血球、卵白、コラーゲン又はゼラチン等の動物性タンパク質、ダイズタンパク質、小麦グルテン、ゼイン、なたねタンパク質、むらさきうまごやしタンパク質、えんどうタンパク質、マメ科タンパク質、綿の実タンパク質、ジャガイモタンパク質、米タンパク質又はごまの実タンパク質等の植物性タンパク質及び穀類のタンパク質等のタンパク質成分を含むものが挙げられる。本発明では、タンパク質原料としてカゼイン、小麦タンパク質又はカツオ節が特に好ましい。
- [0026] 本発明で用いられるタンパク質分解ペプチドは以下のようにして調製することができる。
- [0027] 発芽ダイズ子葉由来プロテアーゼD3によるタンパク質分解物の調製例について記述する。まず、1～10重量%濃度程度のタンパク質水溶液を調製し、必要に応じて加熱処理(例えば、121°Cで15分加熱)した後、該溶液を塩酸又は硫酸等でpH3～6、好ましくはpH3.5～5付近に調整する。このタンパク質溶液にタンパク質分解酵素D3をタンパク質100gあたり0.05～2g、好ましくは0.1～1gの量を添加する。ついで、D3を添加したタンパク質溶液を30°C～50°C(好ましくは35～45°C)で1～100時間、好ましくは24～48時間酵素反応を行う。反応終了後、反応溶液を加熱処理(例えば、80°C、20分加熱処理)して酵素を失活させ、遠心分離でタンパク質分解ペプチドを含有する上清画分を得た。上清部分のpHをNaOHで中性付近に中和し、凍結乾

燥により酵素分解ペプチドを得ることができる。

[0028] 次にGSP分解物の調製例について記述する。

[0029] セリンプロテアーゼGSPによるタンパク質分解ペプチド調製の際、タンパク質水溶液のpHは中性か又は若干アルカリ性であるときに、ペプチド結合の切断につれて下がる傾向にあるので、このタンパク質原料の分解反応中はpHを一定に保つことが好ましい。これはこのタンパク質水溶液を塩基、例えばNaOH、KOH、Ca(OH)<sub>2</sub> 又はNH<sub>3</sub>で滴定することによって行うことができる。pHのモニター及び滴定はpH-スタートにおいて自動的に行うのが好都合である。

[0030] セリンプロテアーゼGSPによるタンパク質分解ペプチド調製例としては、まず1～10重量%濃度程度のタンパク質水溶液を調製し、必要に応じて加熱処理(例えば、121℃で15分加熱)した後、該溶液を塩基(例えば、NaOH、KOH、NaHCO<sub>3</sub>等)でpH7～11、好ましくはpH7～9付近に調整する。このタンパク質溶液に十分な加水分解の程度を得るために、このタンパク質分解酵素GSPをタンパク質100gあたり0.05～2g、好ましくは0.1～1gの量を添加する。ついで、GSPを添加したタンパク質溶液を30℃～50℃(好ましくは40～50℃)で1～48時間、好ましくは4～8時間酵素反応を行う。反応終了後、反応溶液を加熱処理(例えば、80℃、20分加熱処理)して酵素を失活させ、遠心分離でタンパク質分解ペプチドを含有する上清画分を得た。上清部分のpHを中性付近に中和し、凍結乾燥により酵素分解ペプチドを得ることができる。

[0031] 上記のようにしてタンパク質原料をD3及び／又はGSPにより酵素分解してタンパク質分解ペプチド混合物を得る。酵素分解反応は、酵素分解後に得られるペプチドの分子量範囲が、150～20,000、好ましくは500～5,000となるように行う。また、上記酵素分解後に得られるタンパク質分解ペプチド混合物中の低分子量ペプチド成分(分子量150～20,000の範囲、好ましくは500～5,000の範囲)が、得られる全ペプチド混合物の60重量%以上を占めるように酵素分解反応を行なうことが好ましい。

[0032] 本発明の疲労回復剤又は滋養強壮剤(以下、本発明の栄養剤ともいう)は、上述のようにして得られるタンパク質分解ペプチドを含有し、例えば、カプセル剤、散剤、錠剤、顆粒剤、細粒剤、シロップ剤、溶液剤、懸濁剤、直腸内投与剤、注射剤、点滴剤等に製剤化してもよい。これらの製剤は製剤学の分野において汎用の製剤方法に従

って容易に製造することができる。

[0033] また、上述のタンパク質分解ペプチドを含有する疲労回復用食品又は滋養強壮用食品としてもよい。食品の形態としては特に限定されるものではなく、例えば、粉末、固体食、流動食、飲料、ゼリー等が挙げられる。この他に、いわゆるサプリメントのような栄養補助食品等の形態であってもよい。

[0034] 本発明の栄養剤及び食品は、タンパク質分解ペプチドに加えて、その他の栄養成分や薬効成分、並びに製薬分野及び食品分野で通常使用される添加剤等を配合しても良い。そのような追加の成分及び添加剤としては、例えば、アミノ酸、ビタミン、糖質、脂質、たんぱく質、ビタミン、ミネラル、カフェイン又は生薬等が挙げられ、添加剤としては色素、希釈剤、香料、防腐剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、結合剤、界面活性剤、可塑剤等、保存料、酸化防止剤等が挙げられる。

[0035] 本発明の栄養剤及び食品の投与量(摂取量)について説明する。マウスに酵素分解ペプチドを投与した試験の結果ではその投与量が乾燥重量として1g/kgを超える場合において疲労回復作用が認められた。この用量は、動物からヒトへ換算すると、マウスの1日あたりのタンパク摂取量が約0.9gであり、タンパク質分解ペプチドの有効最低投与量が1g/kgの場合、1個体あたりの有効酵素分解ペプチド摂取量は0.025gとなる。この比を成人の1日あたりの必要タンパク質摂取量80gに乘じると、その最低有効投与量は成人の場合2g／日以上が目安となるが、最低有効投与量は体重、年齢、性別及び疲労の程度に応じて変化し、適宜設定できる。本発明の栄養剤又は食品を摂取する時は、1日の必要最低量以上を1回で摂取してもよいし、あるいは複数回に分けて摂取してもよい。

[0036] 本発明の栄養剤及び食品は、疲労時に摂取すると疲労が顕著に回復されるだけでなく、疲労していない健常者においてはその健康を維持したり、あるいは疲労するのを抑止する効果を有する。

[0037] 本明細書は本願の優先権の基礎である特願2004-048417号の明細書に記載される内容を包含する。

### 実施例

[0038] 以下、実施例により本発明を更に説明する。

- [0039] (参考例1) : 酵素分解ペプチドの製法(プロテアーゼを用いたタンパク質加水分解)  
カゼイン、小麦タンパク質又はかつお節粉を含む500mlの懸濁液(この懸濁液は約5%タンパク質(NX6.25)を含有する)に、発芽ダイズ使用由来プロテアーゼD3(タンパク質重量として基質の0.5%)又はGSP(タンパク質重量として基質の1%)を加えた。D3についてはpH4.5、40°Cにて、GSPについてはpH8.0、45°Cにて酵素分解反応を行った。pH-スタート(stat)を用いて酵素分解反応中、pHを4M HCl又は4M NaOHを添加して一定に保持した。D3酵素分解反応は48時間後に、GSP酵素分解反応は6時間後に、pHを中性付近に調整して、80°C、20分間加熱処理して酵素を失活させた。さらに10,000g、5分間の遠心操作で不溶性物質を沈殿させ、可溶性画分のみを凍結乾燥し疲労回復試験に供した。
- [0040] なお、比較に用いたズブチリシン(subtilisin)やペプシンによるタンパク質分解物についても上記方法に従って調製し、酵素添加量はタンパク質重量として基質の0.5%、反応時間は8時間、反応温度は40°Cで酵素分解反応を行った。なお反応pHはズブチリシンを用いた場合にはpH8.0に、ペプシンを用いた場合にはpH2.0に調整した。
- [0041] (実施例1) : 自発運動量の回復  
各群8頭(各群n=8)からなる5週齢のCDF-1系雄性マウス群をトレッドミルにおき、強制歩行運動を3時間負荷した後、それぞれ発芽ダイズ子葉由来プロテアーゼD3で分解した、(1)カゼインペプチド、(2)小麦ペプチドをそれぞれの乾燥重量として1g/kgとなるように経口投与し、その後、赤外線センサー付自発運動量測定装置を用いて60分間の自発運動量を測定し、対照群(コントロール群; 脱イオン蒸留水のみ投与)との比較を行った。結果を図1に示す。
- [0042] 図1に示されるように、小麦ペプチド分解物及びカゼイン分解物を投与した場合に自発運動量の回復が認められ、特にカゼインタンパク分解物においては自発運動量が顕著に増加した。
- [0043] (実施例2)  
各群8頭(各群n=8)からなる5週齢のCDF-1系雄性マウス4群をトレッドミルにおき、強制歩行運動を3時間負荷した後、それぞれ、(1)発芽ダイズ子葉由来プロテアーゼ

D3分解カゼインペプチド、(2)ペプシン分解カゼインペプチド、(3)ズブチリシン分解カゼインペプチド、(4)セリンプロテアーゼ(GSP)分解カゼインペプチドをそれぞれ乾燥重量として1g/kgとなるように経口投与し、その後、赤外線センサー付自発運動量測定装置を用いて60分間の自発運動量を測定し、対照群(コントロール群；脱イオン蒸留水のみ投与)との比較を行った。

[0044] その結果を図2に示す。図2からもわかるように発芽ダイズ子葉由来プロテアーゼD3分解カゼインペプチド及びセリンプロテアーゼ(GSP)分解カゼインペプチドにおいて自発運動量の顕著な増加が認められたが、ペプシン分解カゼインペプチド及びズブチリシン分解カゼインペプチドを投与した群は自発運動量の増加は認められなかった。

[0045] (実施例3)

各群6頭(各群n=6)からなる5週齢のCDF-1系雄性マウス3群をトレッドミルにおき、強制歩行運動を3時間負荷した後、それぞれ、(1)カゼインタンパク、(2)アミノ酸混合物(カゼインタンパクを構成するアミノ酸の混合物:タウリン、アスパラギン酸、スレオニン、セリン、グルタミン酸、プロリン、グリシン、アラニン、バリン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、チロシン、フェニルアラニン、リジン、ヒスチジン、アンセリン、カルノシン、アルギニンの混合物)(3)発芽ダイズ子葉由来プロテアーゼD3分解カツオ節ペプチド、(4)発芽ダイズ子葉由来プロテアーゼD3分解カゼインペプチドをそれぞれ1g/kg経口投与し、その後、赤外線センサー付自発運動量測定装置を用いて60分間の自発運動量を測定し、対照群(コントロール群；脱イオン蒸留水のみ投与)との比較を行った。

[0046] その結果を図3に示した。図にあるようにカゼインタンパク質では効果が認められなかつたのに対し、発芽ダイズ子葉由来プロテアーゼD3分解カツオ節ペプチド、及び発芽ダイズ子葉由来プロテアーゼD3分解カゼインペプチドでは自発運動量の顕著な増加が認められた。

[0047] (実施例4)

各群6頭(各群n=8)からなる5週齢のCDF-1系雄性マウス2群をトレッドミルにおき、強制歩行運動を3時間負荷した後、それぞれ、(1)発芽ダイズ子葉由来プロテアーゼ

D3分解カゼインペプチド1(投与量として0.5g/kg)、(2)発芽ダイズ子葉由来プロテアーゼD3分解カゼインペプチド2(投与量として1g/kg)をそれぞれ経口投与し、その後、赤外線センサー付自発運動量測定装置を用いて60分間の自発運動量を測定し、対照群(コントロール群;脱イオン蒸留水のみ投与)との比較を行った。

[0048] 結果を図4に示す。図4からわかるように発芽ダイズ子葉由来プロテアーゼD3分解は1g/kg量の投与において最も効果が認められた。

[0049] (実施例5)

各群6頭(各群n=8)からなる5週齢のCDF-1系雄性マウス2群をトレッドミルにおき、強制歩行運動を3時間負荷した後、それぞれ、(1)GSP分解カゼインペプチド1(投与量として0.5g/kg)、(2)GSP分解カゼインペプチド2(投与量として1g/kg)、(3)GSP分解カゼインペプチド3(投与量として2g/kg)をそれぞれ経口投与し、その後、赤外線センサー付自発運動量測定装置を用いて60分間の自発運動量を測定し、対照群(酵素分解していないカゼイン、及びコントロール群:脱イオン蒸留水のみ投与)との比較を行った。

[0050] 結果を図5に示す。図5からわかるようにGSP分解カゼインペプチドを0.5g/kgという低投与量でも自発運動量の顕著な増加が認められた。

[0051] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

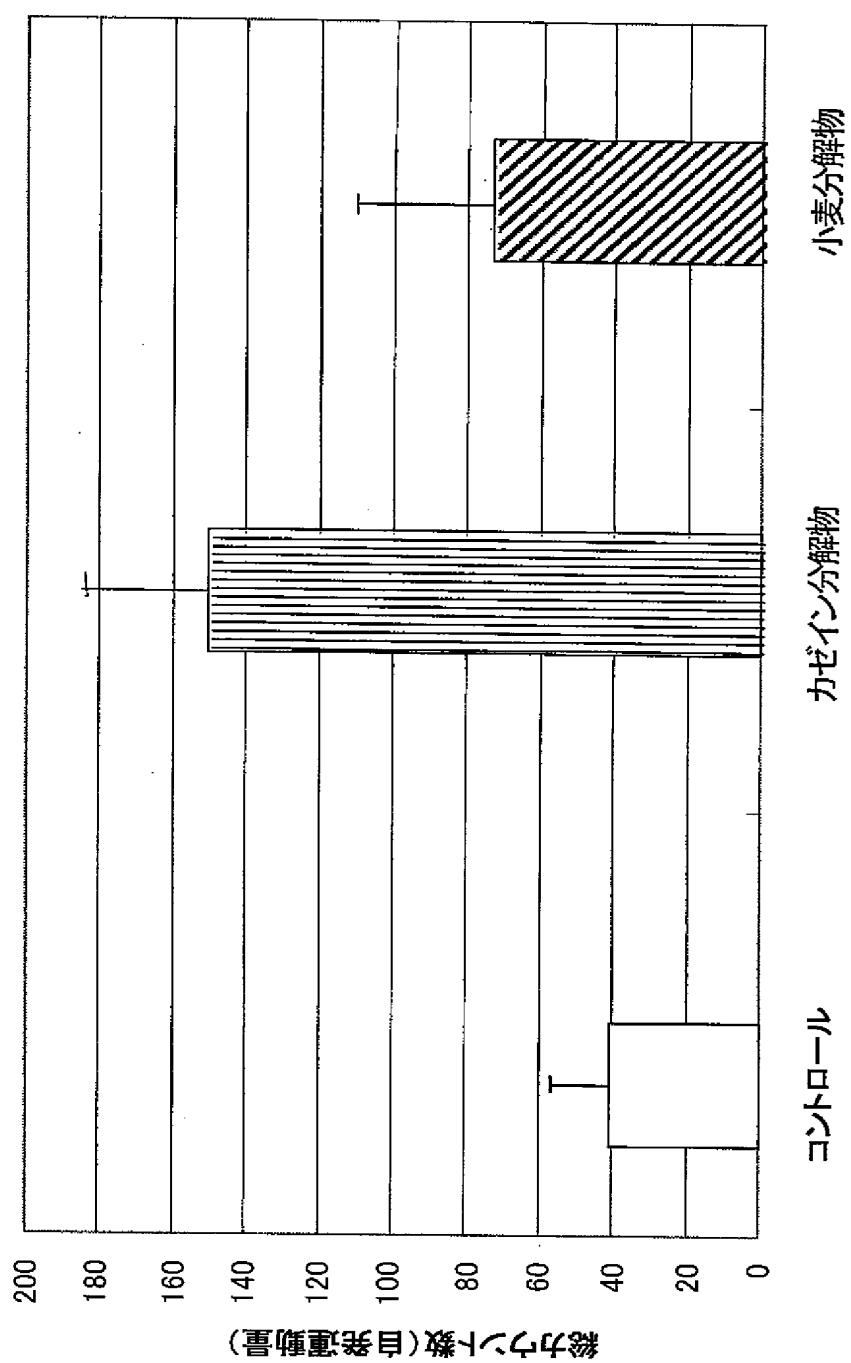
### 産業上の利用可能性

[0052] 本発明の栄養剤及び食品は、疲労状態から健康な状態へと速やかに回復させるための疲労回復剤又は疲労回復食品としてだけでなく、健常者においては疲労を防止するための又は健康状態を維持するための滋養強壮剤又は滋養強壮用食品として有用である。

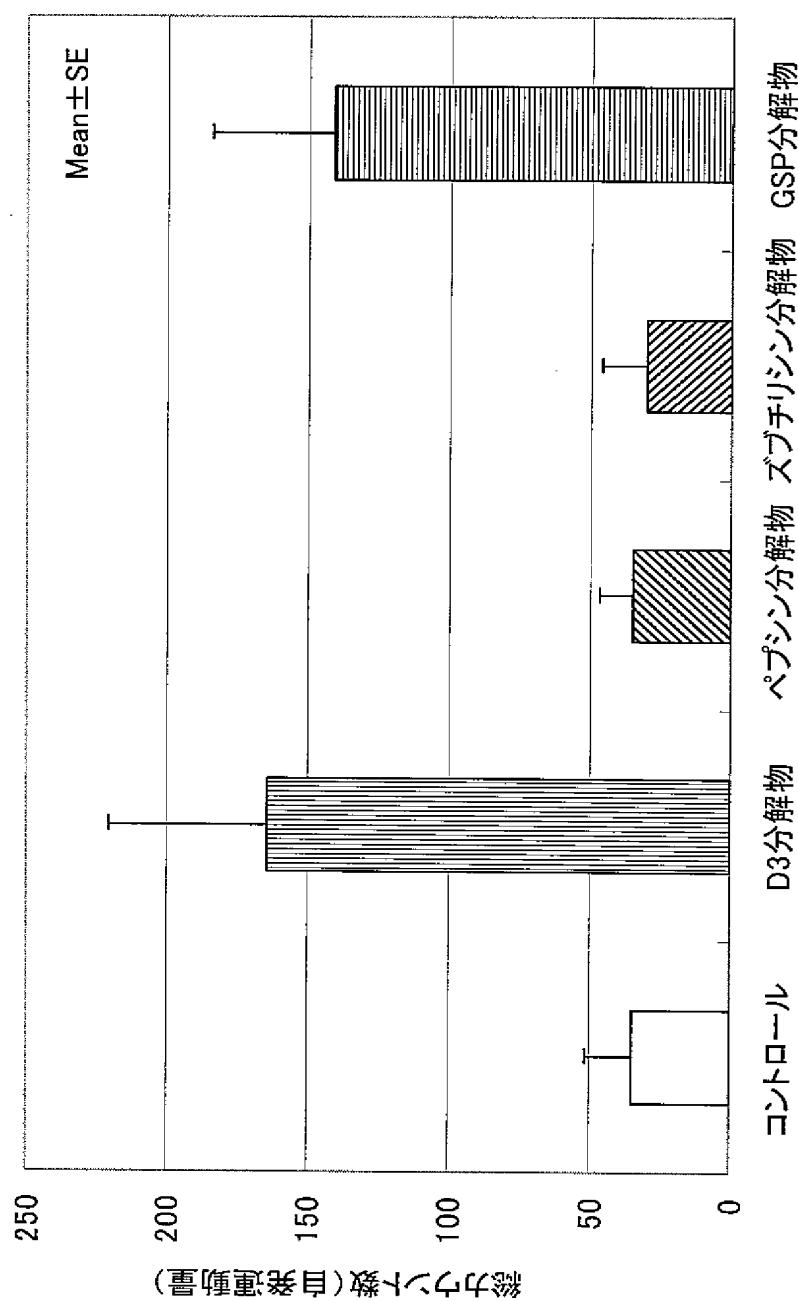
## 請求の範囲

- [1] タンパク質含有原料を、発芽ダイズ子葉由来のチオールプロテアーゼ及び／又は微生物に由来するセリンプロテアーゼにより分解して得られるタンパク質分解ペプチドを含有する疲労回復又は滋養強壮剤。
- [2] 前記タンパク質含有原料が、カゼイン、小麦タンパク質及びカツオ節からなる群より選択される請求の範囲第1項記載の疲労回復又は滋養強壮剤。
- [3] タンパク質含有原料を、発芽ダイズ子葉由来のチオールプロテアーゼ及び／又は微生物に由来するセリンプロテアーゼにより分解して得られるタンパク質分解ペプチドを含有する疲労回復用又は滋養強壮用食品。
- [4] 前記タンパク質含有原料が、カゼイン、小麦タンパク質及びカツオ節からなる群より選択される請求の範囲第3項記載の疲労回復用又は滋養強壮用食品。

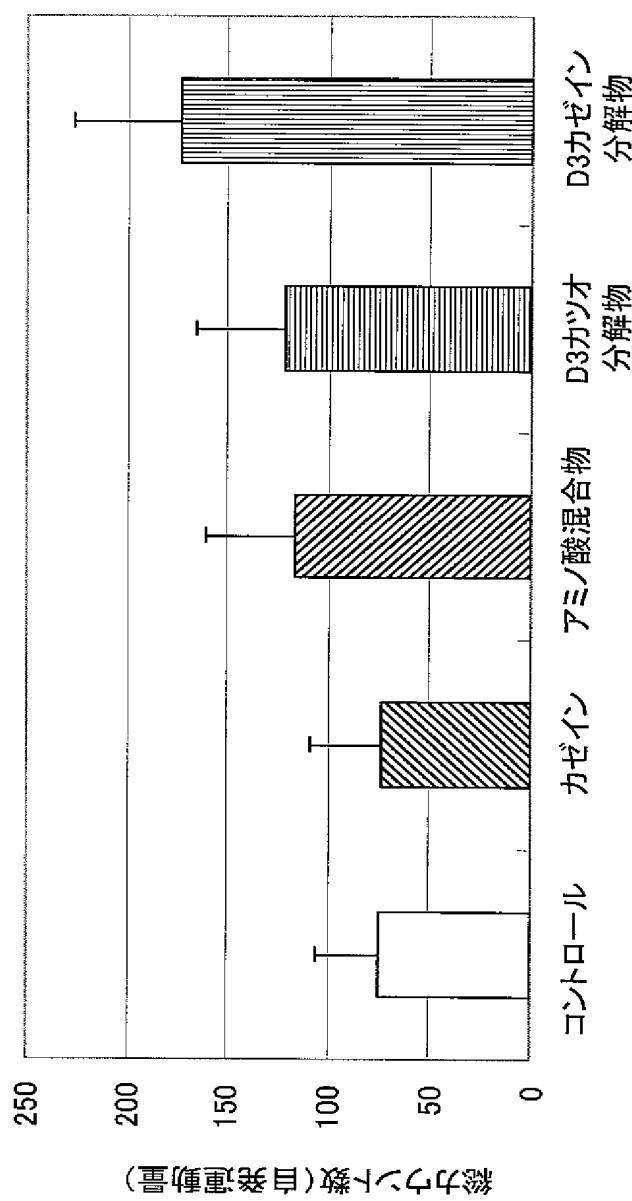
[図1]



[図2]



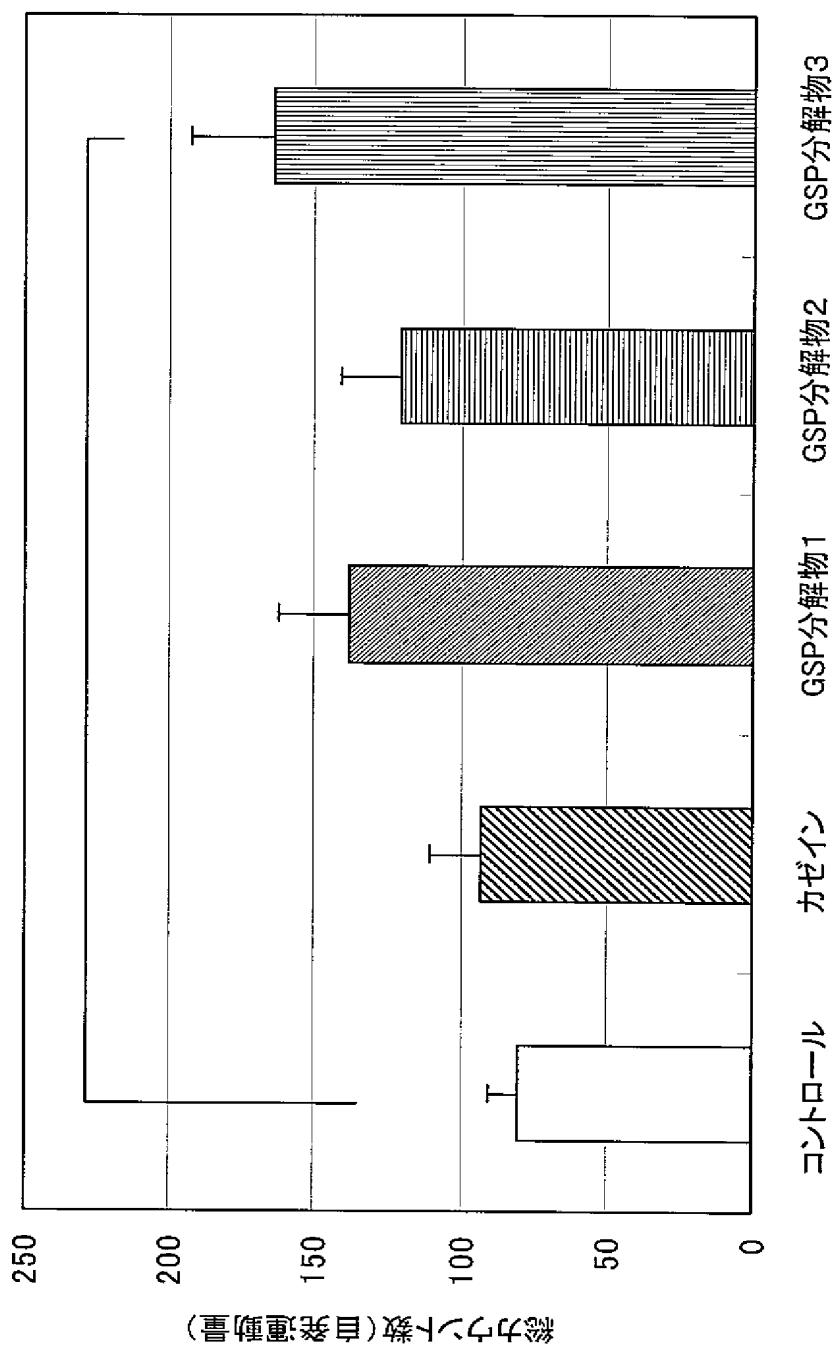
[図3]



[図4]



[図5]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001752

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/00, 38/17, A23L1/30, 1/305, A61P3/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/00, 38/17, A23L1/30, 1/305, A61P3/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPLUS (JOIS)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, Y	JP 5-505524 A (Novo Nordisk A/S), 19 August, 1993 (19.08.93), Full text; particularly, Claims; examples & WO 91/13554 A1 & EP 518999 A1 & US 5523237 A	1-4
X, Y	JP 2000-083695 A (Ajinomoto Co., Inc.), 28 March, 2000 (28.03.00), Full text; particularly, Claims; Par. Nos. [0004], [0010]; examples & US 6455273 B1 & US 2002/168704 A1	1-4
X, Y	JP 8-000264 A (Ajinomoto Co., Inc.), 09 January, 1996 (09.01.96), Full text; particularly, Claims; examples & JP 3503220 B	1-4

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
12 April, 2005 (12.04.05)

Date of mailing of the international search report  
26 April, 2005 (26.04.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2005/001752

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 1-269456 A (Fuji Oil Co., Ltd.), 26 October, 1989 (26.10.89), Full text; particularly, Claims; test results and examples (Family: none)	1-4
Y	JP 63-287462 A (Fuji Oil Co., Ltd.), 24 November, 1988 (24.11.88), Full text; particularly, Claims; examples (Family: none)	1-4

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））  
Int.Cl.<sup>7</sup> A61K38/00, 38/17, A23L1/30, 1/305, A61P3/02

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K38/00, 38/17, A23L1/30, 1/305, A61P3/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPLUS (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X, Y	JP 5-505524 A (ノボ ノルディスク アクティーゼルスカブ) 1993.08.19 全文、特に特許請求の範囲及び実施例参照 & WO 91/13554 A1 & EP 518999 A1 & US 5523237 A	1-4

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.04.2005

国際調査報告の発送日

26.4.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

榎本 佳予子

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

4P 9638

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X, Y	JP 2000-083695 A (味の素株式会社) 2000. 03. 28 全文、特に特許請求の範囲、段落【0004】、【0010】、実施例 参照 & US 6455273 B1 & US 2002/168704 A1	1-4
X, Y	JP 8-000264 A (味の素株式会社) 1996. 01. 09 全文、特に特許請求の範囲及び実施例参照 & JP 3503220 B	1-4
Y	JP 1-269456 A (不二製油株式会社) 1989. 10. 26 全文、特に特許請求の範囲、実験結果及び実施例参照 (ファミリーなし)	1-4
Y	JP 63-287462 A (不二製油株式会社) 1988. 11. 24 全文、特に特許請求の範囲及び実施例参照 (ファミリーなし)	1-4